

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **03-284700**

(43)Date of publication of application : **16.12.1991**

(51)Int.Cl.

C07K 13/00
// C12N 15/12
C12P 21/00
(C12P 21/00
C12R 1:19)

(21)Application number : **02-080676**

(71)Applicant : **TAKARA SHUZO CO LTD**

(22)Date of filing : **30.03.1990**

(72)Inventor : **TAGUCHI YUKI**
ODATE YOICHI
KAWASE YASUAKI
KIMIZUKA FUSAO
KATOU IKUNOSHIN
AZUMA ICHIRO
SAIKI IKUO

(54) FUNCTIONAL POLYPEPTIDE

(57)Abstract:

NEW MATERIAL:A polypeptide obtained by bonding a cell adhesion domain polypeptide of human fibronectin to a region having an adhesion activity to a melanoma cell.

USE: An cancer-metastasis suppresser.

PREPARATION: Respectively necessary necessary regions are initially separated from a vector (e.g.; manifestation plasmid pTF 7520) containing DNA capable of coding a cell adhesion domain and from a vector (e.g.; manifestation plasmid pHD 102) containing DNA capable of coding a peptide region composed of the N-terminal side 25 amino acids of IIICs containing a region having an adhesion activity to B16-F10 melanoma cell and mutually bonded to obtain a vector capable of manifestation of the objective polypeptide. The resultant vector is then introduced to a colibacillus for transformation and the obtained transformant is cultured, thus producing the objective polypeptide.

⑫ 公開特許公報(A)

平3-284700

⑤Int.Cl.⁵

C 07 K 13/00

識別記号

ZNA

庁内整理番号

7731-4H

8717-4B

⑬公開 平成3年(1991)12月16日

C 12 N 15/00

A※

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全8頁)

⑭発明の名称 機能性ポリペプチド

⑯特 願 平2-80676

⑰出 願 平2(1990)3月30日

⑱発 明 者 田 口 由 起 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央研究所内

⑲発 明 者 大 館 洋 一 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央研究所内

⑳発 明 者 川 瀬 靖 聡 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央研究所内

㉑発 明 者 君 塚 房 夫 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央研究所内

㉒出 願 人 寶 酒 造 株 式 会 社 京都府京都市伏見区竹中町609番地

㉓代 理 人 弁 理 士 中 本 宏 外2名

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

機能性ポリペプチド

2. 特許請求の範囲

1. ヒトフィブロネクチンの細胞接着ドメインポリペプチドと、メラノーマ細胞への接着活性部位とが、直接又は間接に結合していることを特徴とする人工の機能性ポリペプチド。
2. 請求項1記載の機能性ポリペプチドを含有していることを特徴とする癌転移抑制剤。
3. ヒトフィブロネクチンのメラノーマ細胞への接着活性部位の機能性ポリペプチドを含有していることを特徴とする癌転移抑制剤。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、新規ポリペプチドに関し、更に詳しくは、ヒトフィブロネクチンの細胞接着ドメインポリペプチドを含有する、新規な人工の機能性ポリペプチド、及びその用途に関する。

〔従来の技術〕

フィブロネクチン(以下、FNと表示する)は血漿や細胞外マトリックスに存在する糖タンパク質で、多彩な機能を持つことが知られている〔アニュアル レビュー オブ バイオケミストリー(Annual Review of Biochemistry)、第57巻、第375～413頁(1988)〕。天然のFNを創傷治癒、点眼薬等の医薬品や化粧品に利用する試みがなされているが、血液から採取するため供給に制限があること、コスト高であること、また、病原性の細菌やウイルス等による汚染の可能性があるなどの理由により、実用化されていない。また、天然のFNの機能ドメインを取出して利用することも同様の理由から実用化されていない。

そこで本発明者らは、ヒトFNの細胞接着ドメインをコードするcDNA断片を発現ベクターに接続して大腸菌に導入することにより、細胞接着活性ポリペプチド及びその製造方法を開発し、特許出願した(特開平1-206998号)。

また、ヒトFNの細胞接着ドメインと、ヘパリン結合ドメイン又はヘパリン結合ドメインとそれに続くⅢcs領域の一部を含む断片とが共有結合した機能性ポリペプチド及びその遺伝子工学的製造方法を開発して、特許出願した(特願平1-131453号)。

更に、これら機能性ポリペプチドの医薬品への応用について研究した結果、これらの多くが癌転移抑制作用を有することを見出し、特許出願した(特願平1-265049号)。しかしながら、これらの癌転移抑制活性は必ずしも充分ではなかった。一方、マッカーシーらはヒトFNのヘパリン結合ドメインとⅢcs領域の一部を含む33-kDa断片に癌転移抑制作用があることを報告している[ジャーナル オブ キャンサー インスティテュート(Journal of National Cancer Institute) 第80巻、第2号、第108頁(1988年)]。

[発明が解決しようとする課題]

しかしながら、33-kDa断片のどの領域にその

作用があるのかは明らかにされていない。

本発明の目的は、癌転移抑制作用の強い新規な機能性ポリペプチドを開発し、その製造方法を提供することにある。

[課題を解決するための手段]

本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は人工の機能性ポリペプチドに関する発明であって、ヒトFNの細胞接着ドメインポリペプチドと、メラノーマ細胞への接着活性部位とが、直接又は間接に結合していることを特徴とする。

また、本発明の第2の発明は癌転移抑制剤に関する発明であって、第1の発明の機能性ポリペプチドを含有していることを特徴とする。

そして、本発明の第3の発明は他の癌転移抑制剤に関する発明であって、ヒトFNのメラノーマ細胞への接着活性部位の機能性ポリペプチドを含有していることを特徴とする。

本発明者らは、Ⅲcs領域を含まないヘパリン結合ドメイン全域をカバーするポリペプチドを遺伝子工学的に作製して癌転移抑制作用を調べ

たところ、全く活性がないことを見出した。

この知見はⅢcs領域が癌転移抑制作用に密接に関係していることを示唆している。本発明者らはB16-F10メラノーマ細胞に対する接着活性を持つことが知られているⅢcsのN末端側25アミノ酸からなるペプチド(以下CS1と表示する)を化学合成して調べた結果、CS1に癌転移抑制作用があることを見出した。更に、CS1と細胞接着ドメインが共有結合した新規ポリペプチドを遺伝子工学的に作製して、その癌転移抑制作用を調べたところ、活性は細胞接着ドメイン単独、あるいはCS1単独の場合に比べて著しく増強されていることを見出した。本発明は以上の知見に基づいて達成された。

以下本発明を具体的に説明する。

本発明に係る新規ポリペプチドは、ヒトFNの細胞接着ドメインポリペプチドとCS1ポリペプチドが共有結合したものであり、遺伝子工学的に作製することができる。例えば、細胞接着ドメインをコードするDNAを含むベクター、

及びCS1領域をコードするDNAを含むベクターから、それぞれ必要な領域を取出して接続することにより、目的のポリペプチドを発現するベクターを作製することができる。各領域間の共有結合は、直接結合であってもよく、間接結合、例えばスパーサーを介した間接結合であってもよい。スパーサーは、細胞接着ドメインとCS1の分子間距離を調節するための挿入配列であり、任意のペプチド鎖を用いることができ、例えばFN分子中のCS1領域の上流配列であってもよい。スパーサー配列は遺伝子工学的に容易に導入することができる。

本発明に係る新規ポリペプチドの具体例としては、下記一般式〔I〕で示されるポリペプチドを挙げることができる。

すなわち下記一般式〔I〕:



[式中C₂₇₇はヒトFN細胞接着ドメインのPro¹²⁰⁹-Ser¹⁵¹⁵に相当する277アミノ酸ポリ

ペプチド残基を示し、下記式〔Ⅱ〕：

¹²³⁹
Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly
Pro Asp Thr Met Arg Val Thr Trp Ala Pro
Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu
Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser Pro Ser
Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser
Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro
Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile
Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile
Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly
Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser
Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val
Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu
Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp

本発明に係るC₂₇₇-CS1は、ヒトFNの細胞接着ドメインのPro¹²³⁹-Ser¹⁵¹⁵（277アミノ酸残基、以下C₂₇₇と表示する）に対応するポリペプチドと、ヒトFNのヘパリン結合ドメインのC末端側に位置するⅢcs領域（71アミノ酸残基）のN末端25アミノ酸（CS1）が結合したものである。

C₂₇₇はベビーハムスター腎細胞(BHK)や正常ラット腎細胞(NRK)などの線維芽細胞に対する接着伸展活性を有することが示されている。一方、CS1はB16-F10メラノーマ細胞が特異的に接着する部位であることが知られている〔ジャーナル オブ セル バイオロジー(J. Cell Biol.)第103巻、第2637~2647頁(1986)及びジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー(J. Biol. Chem.)第262巻、第6886~6892頁(1987)]。更に、メラノーマ細胞の接着には必ずしもCS1の全域が必要なのではなく、その一部でも活性があると言われている〔セル(Cell)、第60巻、第53~61頁(1990)]。

Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala
Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp
Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser
Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser
Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr
Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala
Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser¹⁵¹⁵ . . .〔Ⅱ〕

で表される配列を有し、CS1はヒトFNのⅢcs領域のN末端側25アミノ酸残基を表し、下記式〔Ⅲ〕：

Asp-Glu-Leu-Pro-Gln-Leu-Val-Thr-Leu-Pro-
His-Pro-Asn-Leu-His-Gly-Pro-Glu-Ile-Leu-
Asp-Val-Pro-Ser-Thr . . .〔Ⅲ〕

で表されるペプチド残基、あるいはその一部が欠失した基を示す〕で表されることを特徴とする機能性ポリペプチドである。

本発明に係るCS1は、メラノーマ細胞の接着活性を持つ配列であれば、CS1の全域である必要はない。CS1及びその関連ペプチドは、ペプチド合成機により容易に合成することができる。細胞接着ドメインポリペプチドとメラノーマ細胞接着配列が共有結合したポリペプチドの例としては、前記式〔Ⅰ〕記載のC₂₇₇-CS1が挙げられるが、この新規ポリペプチドは遺伝子工学的に作製するのが有利である。

本発明者らは、既にヘパリン結合ドメインとCS1が結合した296アミノ酸残基ポリペプチド（以下H-296と表示する）を発現するプラスミドを作製し、pHD102と命名した（特願平1-131453号）。

また、このプラスミドを含む大腸菌HB101をEscherichia coli HB101/pHD102と表示して工業技術院微生物工業技術研究所に寄託している〔微工研菌寄第10721号(FERM P-10721)]。

一方、細胞接着ドメインポリペプチドC₂₇₇をコードし、かつ、その3'末端の終止コドンの

直前に他のポリペプチドをコードするDNAを接続するのに有利なクローニングサイトを導入した発現プラスミドpTP7520を構築してある(特願平1-131453号)。

したがって、これらのプラスミドを用いることにより、C₂₇₇-CS1を発現するプラスミドを容易に構築することができる。すなわち、まず、pHD102からヘパリン結合ドメインのC末端側の1個のⅢ型ホモロジー(Ⅲ-16)とCS1を含む領域に対応するDNA断片を取出し、これをpTP7520のC₂₇₇をコードする領域の3'末端のクローニングサイトに接続する。得られたプラスミドから、ヘパリン結合ドメインのⅢ-16に対応するDNAを部位特異的変異の手法により除去することにより、C₂₇₇-CS1を発現するプラスミドを得ることができる(第1図参照)。得られたプラスミドを大腸菌に導入し、適当な条件下に培養することにより、目的ポリペプチドが、大腸菌内に蓄積される。発現の確認にはイムノブロッティングが用いられる。組換え大腸

菌の全菌体タンパク質をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動で分離した後、泳動パターンをニトロセルロース膜に移し取る。ヒトFNの細胞接着ドメインを認識するモノクローナル抗体を作用させた後、標識第2抗体で33-kDa付近のバンドが染色されるのが確認できる。

目的ポリペプチドの精製は例えば次の様に行う。レーブロス等で培養された組換え大腸菌を超音波破碎して上清を得る。

これを陰イオン交換樹脂のカラムに吸着させ、食塩濃度を上げることにより分画する。前記方法により、目的画分を検出し、これを前記抗体を結合させたセファロースカラムに吸着させる。中性付近のバッファーでカラムを洗浄後、pH3付近のバッファーで溶出し、目的画分を検出する。電気泳動的に単一のバンドを与える画分を集めて脱塩した後、凍結乾燥する。得られたポリペプチドは、N末端配列分析及びC末端アミノ酸分析により、目的のものであることを確認する。

このようにして得られたC-CS1ポリペプチドのCS1部分は25アミノ酸残基であるが、前述[セル第60巻、第53～61頁(1990)]のごとくメラノーマ細胞への接着活性に必要な最小単位は、C末端約10アミノ酸に集約することができる。

したがって、C-CS1のCS1部分は、例えばCS1領域のN末端から15番目までの配列を除去したポリペプチドであってもよい。この配列の除去は、対応するDNA配列を部位特異的変異の手法により、除去することで容易に達成することができる。

得られたポリペプチドの細胞接着活性は例えばルオスラティ(Ruoslahti)等の方法[メソジーズ イン エンザイモロジー(Methods in Enzymology)、第82巻、第803～831頁(1981)]に準じて行う。すなわち、試料をコートした後BSAでブロッキングしたマイクロタイタープレートに、BHK又はB16-F10細胞の懸濁液を添加し、37℃で約1時間インキュベートした後、

洗浄する。吸着した細胞をホルマリン固定し、伸展した細胞の割合を顕微鏡下に測定することにより細胞接着活性を測定することができる。このようにしてC₂₇₇-CS1は、BHKよりもB16-F10細胞に対して強い親和性を示すことが示された。

本発明に係るポリペプチドの癌転移抑制活性の測定は例えば次のように行う。高転移性のB16-BL6メラノーマ細胞を、PBSに溶解した試料と混合し、マウスの尾静脈に投与する。約2週間後の肺に転移したコロニーを計測する。以上の実験により、CS1及びC₂₇₇-CS1に癌転移抑制効果のあることが示される。また、その効果は、CS1よりも、C₂₇₇-CS1の方が強いことが示される。

以上のようにして得られた本発明のポリペプチドを医薬として使用する場合、必要に応じて医薬用担体と共に常法により製剤化し、経口投与又は非経口投与すればよい。賦形剤あるいは担体としては薬理学的に許容されるものが選ば

れ、その種類及び組成は投与経路や投与方法によって異なる。例えば液状担体として水、アルコール類若しくは大豆油、オリーブ油、ミネラル油等の動植物油、又は合成油が用いられる。固体担体としてマルトース、シュクロースなどの糖類、アミノ酸類、ヒドロキシプロピルセルロースなどのセルロース誘導体、ステアリン酸マグネシウムなどの有機酸塩などが使用される。

注射剤の場合は溶解液は生理食塩液、各種緩衝液、グルコース、イノシトール、マンニトール、ラクトースなどの糖類溶液、エチレングリコール、ポリエチレングリコールなどのグリコール類が望ましい。またイノシトール、マンニトール、ラクトース、シュクロース等の糖類、フェニルアラニン等のアミノ酸等の賦形剤と共に凍結乾燥製剤とし、それを投与時に注射用の適当な溶剤、例えば滅菌水、生理食塩液、ブドウ糖液、電解質溶液、アミノ酸溶液等静脈投与用液体に溶解させて投与することもできる。製

剤中における本発明のポリペプチドの含量は製剤により異なるが、通常0.1～100重量%好ましくは1～98重量%である。例えば注射液の場合には、通常0.1～30重量%、好ましくは1～10重量%の有効成分を含むようにすることが望ましい。経口投与する場合には前記固体担体若しくは液状担体と共に、錠剤、カプセル剤、粉剤、顆粒剤、液剤、ドライシロップ剤等の形態で用いられる。カプセル、顆粒、粉剤は一般に5～100重量%、好ましくは25～98重量%の有効成分を含む。

投与量は、患者の年齢、体重、症状、治療目的等により決定されるが治療量は一般に、非経口投与で1～100mg/kg/日、経口投与で5～500mg/kg/日である。

また、C57BL/6 マウスを用いた、機能性ポリペプチドの毒性試験において、本ポリペプチド100mg/kgの静脈内投与で毒性は認められない。

〔実施例〕

以下、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されない。

参考例1 C S 1 ペプチドの合成

25 アミノ酸から成るC S 1 ペプチドは、Fmoc法により、化学合成した。試薬及び装置は、LKB社のものを用い、0.2mmolスケールで合成した。合成後、常法により脱保護し、逆相HPLCにより目的画分を分取し、凍結乾燥した。収量は100mgであった。得られたペプチドは、プロテインシーケンサー（モデル477A/120A、アプライドバイオシステムズ社）により正しい配列であることを確認した。

また、アミノ酸分析の結果も予想通りであった。

実施例1

ヒトFNの細胞接着ドメインPro¹²³³-Ser¹⁵¹⁵（277アミノ酸残基）とC S 1との融合タンパク質をコードするcDNA断片のクローニング（第1図参照）

(1-1) pHDI02への NcoI サイトの導入

pHD102はヘパリン結合ドメインとC S 1が結合したポリペプチドH-296を発現するプラスミドであり、特願平1-131453号明細書中に記載されている。H-296から、ヘパリン結合部位を除去するために、まずpHD101のAla¹⁰⁷¹に対応する配列の直前にNcoIサイトを導入した。NcoIサイトの導入には、変異導入用プライマーとしてd[pATCAATGGCCATGGTGGAGGCG]を用い、変異導入用キットとして、サイトダイレクテッドミュータジェネシスシステムミュータターK〔宝酒造㈱販売〕を用いた。実験は添付のプロトコールに従って行い、目的のプラスミドを得た。

(1-2) NcoI-HincII断片の調製

(1-1)で得たプラスミド1μgをNcoI及びHincIIで分解し、アガロース電気泳動で分離して1.3kbのNcoI-HincII断片約120ngを回収した。

(1-3) NcoI-HincII断片のpTF7520へのクロ

ーニング

pTF7520 はヒト FN の細胞接着ドメインポリペプチド C₂₇₇ を発現することができ、かつ、その C 末端に対応する部位に NcoI サイトが付加されており、他のポリペプチドをコードする DNA を接続することができる発現プラスミドである。このプラスミドは特願平 1-131453 号明細書中に記載されている。pTF7520 を NcoI 及び HincII で分解後、脱リン酸した。このプラスミド 50 ng を (1-2) で得た NcoI-HincII 断片 50 ng と共に 5 μl 溶液とし、20 μl の DNA ライゲーションキット〔宝酒造 販売〕A 液、5 μl の B 液を加え、16℃で 30 分インキュベートした。この反応液 10 μl を用いて大腸菌 HB101 を形質転換し、細胞接着ドメイン Pro¹²³⁹-Ser¹⁵¹⁵ (277 アミノ酸残基) と H-296 の Ala¹⁸⁷¹-Thr¹⁹⁸⁵ (115 アミノ酸残基) が Met を介して結合した融合タンパク質 (C₂₇₇-Met-H₁₁₅) を発現するプラスミドを得た。

実施例 2 組換え体からのペプチドの精製

実施例 1 で得た *Escherichia coli* HB101/pCS25 を 50 μg/ml のアンピシリンを添加した 5 ml のレーブロスを含む試験管で 37℃、一夜振とう培養した。これを 500 ml の同培地を含む 2 l の三角フラスコに接種し、100 rpm で培養を続け、20 時間後に集菌した。菌体の一部を用いてイムノブロッティングを行った。すなわち、全菌体タンパク質を SDS-PAGE で分離し、泳動パターンをニトロセルロースメンブランに転写した後、ヒト FN の細胞接着ドメインを特異的に認識するモノクローナル抗体 FN-10〔宝酒造 販売〕を作用させ、次いでパーオキシダーゼ標識第 2 抗体を作用させた。結合した第 2 抗体のパーオキシダーゼ活性を 4-クロロ-1-ナフトールと過酸化水素の存在下で発色させ、33 kD 付近に目的のペプチドが生産されていることを確認した。次に、全菌体ペレットを 20 mM トリス (Tris)-HCl (pH 7.5)、1 mM-BDTA、5 mM メルカプトエタノール、3 μM パラアミジノ

(1-4) Met 及び Ala¹⁸⁷¹-Thr¹⁹⁸⁵ に対応する配列の除去

(1-3) で得たプラスミドから、Met 及び Ala¹⁸⁷¹-Thr¹⁹⁸⁵ (90 アミノ酸残基) に対応する配列を部位特異的変異の手法により除去した。Met 及び Ala¹⁸⁷¹-Thr¹⁹⁸⁵ (90 アミノ酸残基) に対応する配列の除去は、オリゴヌクレオチド d [pGGGAAGCTCGTCGGATGGTTTGTTC] を合成し、サイトダイレクテッドミュータジェネシスシステムミュータナー K (宝酒造 販売) を用いて行った。その結果、細胞接着ドメイン Pro¹²³⁹-Ser¹⁵¹⁵ (277 アミノ酸残基) と CS1 が直接結合した融合タンパク質 (C₂₇₇-CS1) を発現するプラスミドを得、pCS25 と命名した。

またこのプラスミドを保持する大腸菌 HB101 は *Escherichia coli* HB101/pCS25 と表示し、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている〔微工研菌寄第 11339 号 (PERM P-11339)〕。

フェニルメタンスルホンフルオリド (p-APMSF) を含む溶液に懸濁して、超音波処理を行った。12000 rpm で 20 分遠心して、上清 25 ml を得た。これを 20 mM トリス-HCl (pH 7.5) バッファーで平衡化した DE-53 のカラム (40 ml) に通した。カラムを 0.1 M NaCl を含む 20 mM トリス-HCl (pH 7.5) バッファーで洗浄後、0.15 M NaCl を含む 20 mM トリス・HCl (pH 7.5) バッファーで溶出し、分画した。溶出液のイムノブロッティングを行い、目的画分を集めた。次に、この画分をモノクローナル抗体 FN-10 を結合させたセファロース 4B のカラム (10 ml) に通した。カラムを 0.1 M NaCl を含む 20 mM トリス・HCl (pH 7.5) バッファーで洗浄後、0.1 M グリシン・HCl (pH 3.0) バッファーで溶出し、分画した。イムノブロッティングにより目的画分を集め、脱塩、凍結乾燥して、電気泳動的にほぼ単一のペプチド約 7.5 mg を得た。ABI 社のペプチドシーケンサー 477A/120A を用いて、本ペプチドの N 末端からのアミノ酸配列を調べ

たところ目的のペプチドのN末端配列と一致した。また、カルボキシペプチダーゼP〔宝酒造(株)販売〕消化法により、C末端はThrであることが確認された。

実施例3 細胞接着活性の測定

実施例2で得られたC₂₇₇-CS1ポリペプチドのBHK及びマウスメラノーマ細胞B16-F10に対する細胞接着活性を測定した。

細胞接着活性は、ルオスラティらの方法〔メソックス イン エンザイモロジー、第82巻、第803～831頁(1981)〕に準じて測定した。試料を蒸留水、PBS(リン酸緩衝化生理食塩水)等に溶かし、96穴マイクロプレート上で段階的に希釈した。4℃、2時間インキュベートして、試料をプレート上に吸着させた(50μl/ウェル)。3%BSAを含むPBS溶液を100μl/ウェル加え、37℃、1時間インキュベートしてプレートをブロックした。PBSでプレートを洗浄後、あらかじめダルベッコ(Dulbecco's)イーグル最小栄養培地(DMEM)に5×10⁵

細胞/mlとなるように懸濁させたベビーハムスター腎細胞(BHK-21)、又はマウスメラノーマ細胞B16-F10を100μl/ウェル分注し、37℃、1時間インキュベートした。なお使用した細胞は、凍結保存した株を継代培養後、トリプシン処理(37℃、5分)したものを用いた。PBSでプレートを洗浄後、3%ホルマリン溶液で細胞をプレート上に固定した。

顕微鏡下でBHK-21細胞、又はB16-F10細胞の伸展を観察し、伸展細胞数が、ヒトFNの高濃度における伸展細胞数の50%となる試料の濃度(ED₅₀)を求め細胞接着活性の指標とした。

その結果を第1表に示す。

| 試 料 | 第 1 表 細胞接着活性 ED ₅₀ (pmol/ml) | |
|-----------------------|--|------------|
| | BHK-21細胞 | B16-F10 細胞 |
| C ₂₇₇ -CS1 | 48～96 | 9.8～24.6 |
| ヒトFN | 3 | 4.5 |

以上の結果、C₂₇₇-CS1は、BHK細胞よりも

B16-F10メラノーマ細胞に対して、強い細胞接着活性を持つことが示された。

実施例4 癌転移抑制試験

化学合成したCS1ペプチド及びC₂₇₇-CS1を用いて実験的肺転移に対する影響を調べた。C57BL/6マウス5匹を一群として、PBSに溶解した試料とB16-BL6メラノーマ細胞(3×10⁴)を混合した後、マウスの尾静脈に投与した。2週間後に肺に転移したコロニー数を計測してコントロールと比較した。

その結果を第2表に示す。

| 第 2 表 | | |
|-----------------------|----------|-----------|
| 試 料 | 投 与 量 | 転 移 結 節 数 |
| PBS | — | 61 ± 16 |
| CS1ペプチド | 1 mg/マウス | 26 ± 2 |
| C ₂₇₇ -CS1 | 1 mg/マウス | 22 ± 4 |

以上の結果、CS1ペプチドに癌転移抑制作用があることが示された。また、CS1と細胞接着ドメインポリペプチドとの融合ペプチドは

更に強い転移抑制効果を持つことが示された。

実施例5

実施例2で得たポリペプチド30重量部に對しPBSを加え、全量を2000重量部としてこれを溶解後、ミリポアフィルターGSタイプを用いて除菌ろ過する。このろ液2gを10mlのバイアル瓶にとり凍結乾燥し、1バイアルに該ポリペプチド30mgを含む凍結乾燥注射剤を得た。

〔発明の効果〕

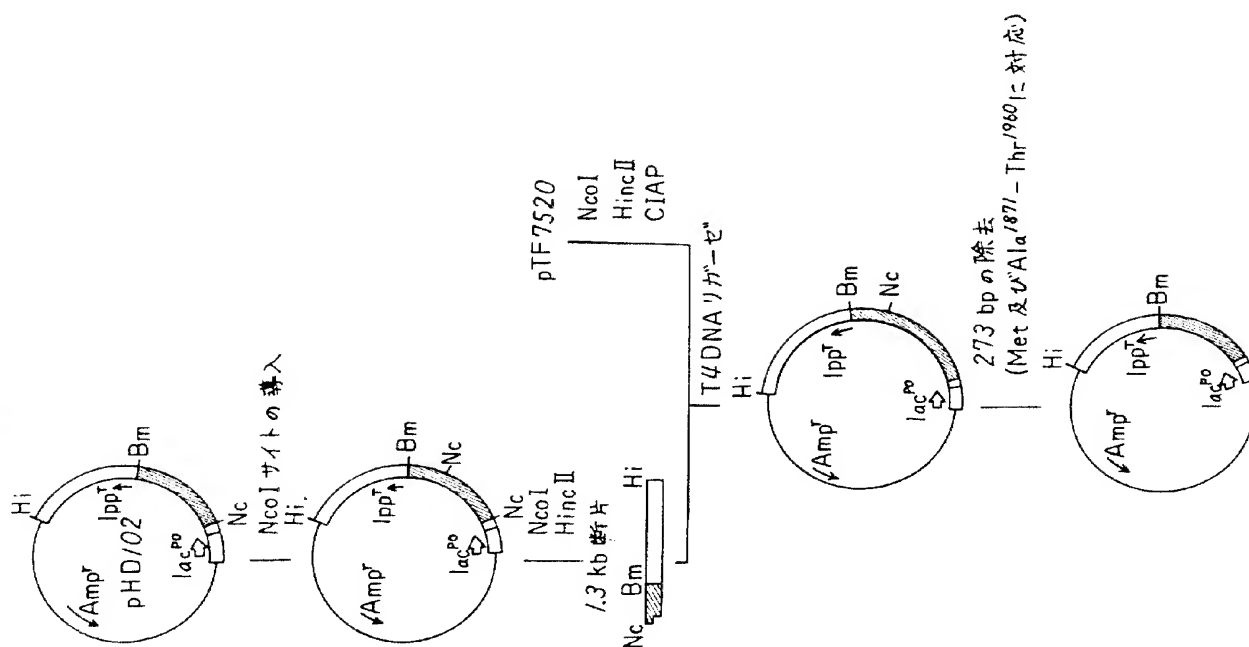
以上述べたごとく、本発明により、癌転移抑制作用を持つ新規ポリペプチド及びその製造方法が提供される。

4. 図面の簡単な説明

第1図はC₂₇₇-CS1ポリペプチドを発現させるためのプラスミドの構築の工程図を示す。

| | |
|-------|---------|
| 特許出願人 | 寶酒造株式会社 |
| 代理人 | 中 本 宏 |
| 同 | 井 上 昭 |
| 同 | 吉 嶺 桂 |

第 1 頁 / 図



第 1 頁の続き

⑤Int. Cl. ⁵

// C 12 N 15/12
 C 12 P 21/00
 (C 12 P 21/00
 C 12 R 1:19)

識別記号

庁内整理番号

C 8214-4B

⑦発明者 加藤 郁之進 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社中央研究所内

⑦発明者 東 市郎 北海道札幌市南区真駒内上町 5 丁目 3 番 2 号

⑦発明者 済木 育夫 北海道札幌市西区八軒三条西 3 丁目 6 番 7-45 号